

**P**roductivité et qualité sont deux grands objectifs de la recherche sur le cacao. L'obtention de variétés clonales des principaux génotypes garantirait une production homogène. Leur création par embryogenèse somatique soulève des espoirs très concrets. Des étapes restent à maîtriser, des solutions sont proposées.



# Embryogenèse somatique du cacaoyer à partir de pièces florales

**Alemanno L.<sup>1</sup>, Berthouly M.<sup>1</sup>, Michaux-Ferrière N.<sup>2</sup>**

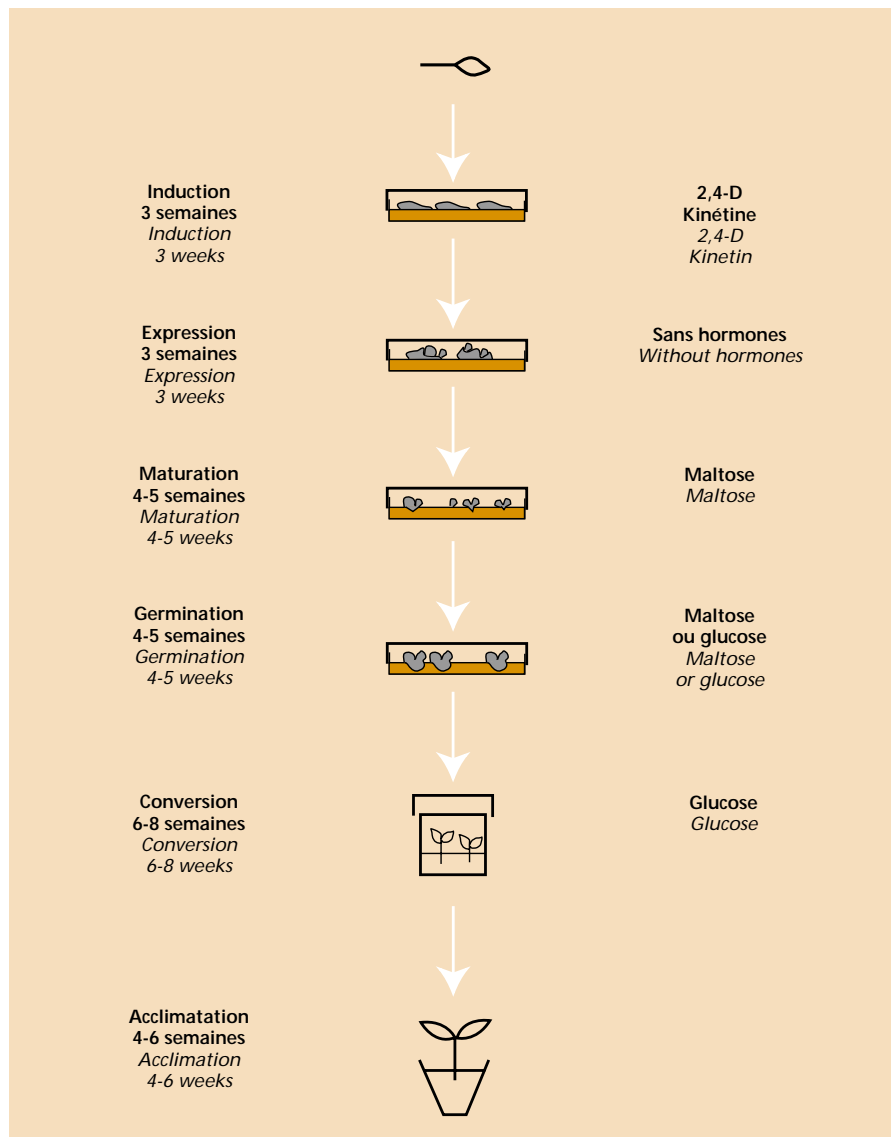
<sup>1</sup> CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

<sup>2</sup> CIRAD-GERDAT, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

**O**riginaire d'Amérique tropicale, le cacaoyer a toujours joué un rôle économique important. Servant de monnaie d'échange chez les Aztèques et les Mayas il représente, de nos jours, une source importante de revenus pour plusieurs pays en développement. Le CIRAD participe aux recherches sur le cacaoyer avec deux objectifs principaux : l'augmentation de la productivité des plantations et l'amélioration de la qualité du cacao. L'amélioration génétique occupe une large place parmi les moyens disponibles pour augmenter la productivité. Elle a permis, en effet, la création de variétés améliorées : clones et hybrides interclonaux. Toutefois, les sélectionneurs sont confrontés à deux difficultés. D'une part, s'agissant d'une plante pérenne, les programmes de sélection classique s'étendent sur plusieurs années : 15 ans en moyenne pour un cycle de sélection. D'autre part, le cacaoyer étant préférentiellement allogame et donc très

hétérozygote, les hybrides présentent souvent une forte variabilité intrafamille. L'introduction, dans les programmes de sélection, d'une méthode de multiplication végétative efficace réduirait la durée des cycles de sélection et multiplierait les individus hybrides remarquables issus des combinaisons en évaluation. Des variétés clonales pourraient ainsi être distribuées aux producteurs, leur assurant une meilleure homogénéité de production.

La multiplication végétative horticole (bouturage et greffage) présente plusieurs inconvénients. La multiplication par greffage, utilisée en Malaisie au sein de plantations industrielles, demande une bonne technicité et présente le risque de débourrement du porte-greffe. Les boutures plagiotropes possèdent un système aérien déséquilibré et surtout un système racinaire traçant qui rend la plante peu résistante à la sécheresse. Les boutures orthotropes développent un pivot, mais la



**Figure 1.** Protocole d'embryogenèse somatique de *Theobroma cacao* L./ Protocol for somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L.

hauteur de formation de la couronne est inférieure à celle des semenceaux. De plus, le nombre de greffons orthotropes prélevables par arbre est faible. C'est pourquoi le développement d'une méthode de multiplication en masse conforme et rapide, telle que l'embryogenèse somatique, constitue un espoir pour l'amélioration génétique du cacaoyer. Elle a été obtenue à partir d'embryons zygotiques immatures par Esan dès 1977. Mais, à cause de l'allogamie préférentielle de cette plante qui aboutit à des descendance hétérogènes, l'embryogenèse somatique à partir de tissus sporophytiques : feuille, nucelle, tégument interne, pétale a été étudiée et a donné des résultats variables et peu satisfaisants. Les premières productions effi-

caces d'embryons somatiques à partir de boutons floraux, et leur conversion en plantules sont rapportées par Söndahl *et al.* (1993) ainsi que Lopez-Baez *et al.* (1993). Cette dernière étude se situe à la base de nos travaux dont une synthèse est présentée ici. Ces travaux ont consisté, dans un premier temps, à tester cette technique sur une base génotypique plus large, sur des clones appartenant aux trois groupes de cacaoyer (Forastero, Criollo, Trinitario). Ces études, couplées à des analyses histologiques et biochimiques, ont apporté des éléments de compréhension du phénomène et mis en évidence ses principales contraintes. A partir de ces constatations, des travaux visant à améliorer ces points ont été menés.

## Description et définition du protocole de culture

L'embryogenèse somatique est le phénomène par lequel une cellule, ou un groupe de cellules somatiques, est capable de former un embryon, c'est-à-dire une structure à symétrie bilatérale indépendante du cal, possédant un apex caulinaire et un apex racinaire et dont le développement donnera naissance à une plantule. Ce processus est rendu possible par une particularité des cellules végétales : la totipotence, c'est-à-dire la capacité des cellules déjà spécialisées à se dédifférencier, à se diviser puis se différencier à nouveau, en fonction des conditions expérimentales. Les embryons somatiques obtenus possèdent le même génotype que celui de la plante dont ils sont issus.

L'embryogenèse somatique est obtenue, chez le cacaoyer, selon la technique décrite par Lopez-Baez *et al.* (1993) à partir de staminodes et filets d'anthères prélevés sur des boutons floraux immatures. Elle se déroule en plusieurs étapes (figure 1) : des cals sont d'abord induits par un choc hormonal (2,4-D/kinétine) (photo 1) sur un milieu d'induction. Transférés sur un milieu d'expression sans hormones, ces cals régénèrent des embryons somatiques (photo 2). Ces derniers sont ensuite transférés successivement sur milieux de maturation, de germination et de croissance avant d'être acclimatés en serre.

## Analyse du procédé et détermination des contraintes

### Evaluation de la variabilité génotypique

Le tableau présente les taux d'explants embryogènes obtenus à partir des staminodes et filets d'anthères pour tous les génotypes évalués. Le groupe génétique auquel ils appartiennent est mentionné.

Parmi les 25 génotypes testés, seuls 5 se sont révélés embryogènes. Ils appartiennent au groupe des Forastero Hauts-Amazoniens et présentent des réactivités très différentes, de 81,5 à 1,2 % d'explants embryogènes. La réponse à l'embryogenèse somatique montre une variabilité certaine selon le génotype, facteur bien connu dans ce processus. Même si cette étude est insuffisante pour conclure sur la corrélation entre la réponse à l'embryogenèse et l'appartenance à un groupe, nous constatons que les génotypes ayant montré une

Embryogenèse (%) de plusieurs génotypes de *Theobroma cacao* L. / Embryogenesis (%) of several *Theobroma cacao* L. genotypes.

Génotype <i>Genotype</i>	Nbre d'explants* mis en culture <i>No. of explants cultured*</i>	Explants*embryogènes (%) <i>Embryogenic explants* (%)</i>	Groupe génétique <i>Genetic group</i>
NA 79	54	81,5 <sup>a</sup>	Forastero Haut-Amazonien
UPA 603	64	43,7 <sup>b</sup>	Forastero Haut-Amazonien
T 85/799	90	34,4 <sup>b</sup>	Forastero Haut-Amazonien
UPA 409	24	12,5 <sup>c</sup>	Forastero Haut-Amazonien
SCA	84	1,2 <sup>d</sup>	Forastero Haut-Amazonien
NA 32	12	0 <sup>d</sup>	Forastero Haut-Amazonien
UPA 604	120	0 <sup>d</sup>	Forastero Haut-Amazonien
UPA 405	16	0 <sup>d</sup>	Forastero Haut-Amazonien
EBC 148	28	0 <sup>d</sup>	Forastero Haut-Amazonien
LCTEEN 165	36	0 <sup>d</sup>	Forastero Haut-Amazonien
T 79/501	18	0 <sup>d</sup>	Forastero Haut-Amazonien
T 79/467	20	0 <sup>d</sup>	Forastero Haut-Amazonien
IMC 67	93	0 <sup>d</sup>	Forastero Haut-Amazonien
IFC 1	15	0 <sup>d</sup>	Forastero Bas-Amazonien
IFC 2	30	0 <sup>d</sup>	Forastero Bas-Amazonien
191	14	0 <sup>d</sup>	Forastero Bas-Amazonien
Catongo	42	0 <sup>d</sup>	Forastero Bas-Amazonien
R 106	46	0 <sup>d</sup>	Criollo
R 2	10	0 <sup>d</sup>	Criollo
D 38	22	0 <sup>d</sup>	Criollo
R 43	76	0 <sup>d</sup>	Trinitario
R 10	16	0 <sup>d</sup>	Trinitario
ICS 1	9	0 <sup>d</sup>	Trinitario
GS 36	12	0 <sup>d</sup>	Trinitario
CC 222	10	0 <sup>d</sup>	Trinitario

Forastero Haut-Amazonien = *Upper Amazon Forastero*  
Forastero Bas-Amazonien = *Lower Amazon Forastero*

\* Les 5 staminodes et 5 anthères d'une fleur sont considérés comme 1 explant. / *The 5 staminodes and 5 anthers from one flower were considered as 1 explant.*

Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 %, avec le test de comparaison de deux proportions estimées sur deux échantillons indépendants ; test bilatéral. / *Values followed by the same letter are not significantly different at the 5% level, using a test comparing two proportions estimated on two independent samples; bilateral test.*

capacité à l'embryogenèse sont tous des Forastero Hauts-Amazoniens (qui sont toutes les clones les plus représentés). Il est intéressant de noter que les génotypes embryogènes rapportés par Lopez-Baez *et al.* (1993) appartiennent aussi au groupe Forastero : EET 48, EET 64, EET 94, EET 228 (Forastero équatoriens) et CC 260 (Forastero « Nacional »).

### Origine des embryons somatiques

Pour les génotypes embryogènes dans nos conditions de culture, une étude histologique (Alemanno *et al.*, 1996) a permis d'établir l'origine des embryons somatiques. Ainsi, à la fin de la période de callogenèse, les cals sont constitués de nodules (photo 3), eux-mêmes formés de groupes plus ou moins importants de cellules méristématiques, entourés de cellules de type parenchymateux. Sur le milieu d'expression, les cellules méristématiques se divisent pour donner des zones méristématiques bien

développées. Environ une semaine après, certaines cellules méristématiques acquièrent des caractères embryonnaires, c'est-à-dire des caractères rencontrés au sein des cellules de jeunes embryons zygotiques. Les cellules possèdent un fort rapport nucléocytoplasmique, un cytoplasme dense et riche en protéines solubles et un gros noyau avec un nucléole à coloration dense et de volume important. Ces cellules ne comportent pas de réserves amylacées. Un certain nombre de ces cellules se regroupent et s'isolent de celles avoisinantes. A cause de leur devenir, ces ensembles cellulaires peuvent être considérés comme des proembryons (photo 4). Ils acquièrent un protoderme, des faisceaux procambiaux, puis des méristèmes, caulinaire et racinaire, passant par les stades suivants : globulaire, coeur et cotylédonaire (photo 5) mimant les étapes de l'ontogenèse des embryons zygotiques. Les embryons somatiques sont donc d'origine pluricellulaire. Le cal qui entoure les

embryons est constitué de cellules hautement différenciées et en cours de dégénérescence, conjointement à l'accumulation de polyphénols.

Les embryons somatiques montrent différents degrés de conformité morphologique par rapport aux embryons zygotiques. Certains embryons portent plus de deux cotylédons, d'autres sont fusionnés. Nous avons également observé des structures embryonnaires isolées possédant un protoderme, des faisceaux procambiaux mais sans méristème apical. De telles structures ne poursuivent pas leur évolution en embryons somatiques et sont qualifiées d'embryons « troncs ». Dans les conditions standard, la répartition des embryons du génotype NA 79 dans chacune des catégories est la suivante : embryons normaux : 20,7 %, embryons fusionnés : 6,5 %, embryons « troncs » : 72,8 %, ce qui représente une faible proportion d'embryons normaux.

## Les phases tardives de l'embryogenèse somatique

Pour que l'embryogenèse somatique puisse être utilisée dans les programmes d'amélioration génétique, il est indispensable qu'une fois obtenus les embryons somatiques puissent évoluer en plantules. Si, dans de nombreux exemples d'embryogenèse somatique, les conditions d'obtention d'embryons somatiques ne posent plus de problèmes, en revanche, chacune des phases ultérieures est très souvent limitante (Redenbaugh, 1993), ce qui réduit les possibilités d'utilisation pratique de ce procédé de multiplication. Nous avons rencontré ces problèmes chez le cacaoyer, puisqu'au cours de nos expérimentations préliminaires, aucune plantule n'a pu être obtenue.

À la suite de ces premières études, il est possible d'identifier plusieurs contraintes au cours du procédé d'embryogenèse somatique à partir de boutons floraux :

- dans les conditions décrites, il n'existe pas de multiplication entretenue des cellules à l'origine des embryons somatiques (cellules méristématiques et embryonnaires), donc pas d'entretien de la capacité embryogène, condition indispensable pour augmenter l'efficacité et donc l'utilisation de cette technique ;
- l'origine pluricellulaire des embryons somatiques présente une difficulté supplémentaire pour la transformation génétique ;
- les embryons somatiques présentent très souvent des anomalies morphologiques ce qui gêne leur conversion future ;
- des difficultés de maturation, germination et conversion des embryons sont décelées ;
- la variabilité génotypique est importante et s'observe à chacune des phases de l'embryogenèse somatique.

Des recherches visant à améliorer certaines de ces étapes ont été entreprises et les résultats décrits.

## Les améliorations du procédé

### Vers l'entretien de la capacité embryogène via un cal friable

La voie du cal friable embryogène est très intéressante pour plusieurs raisons. Ce type de cal permet l'entretien de la capacité embryogène chez plusieurs espèces soit en milieu solide comme l'hévéa (Montoro *et al.*, 1993), soit en milieu liquide comme le bananier (Grapin, 1995). Ceci rend possible

la diminution des contraintes liées à l'explant, l'expression de l'embryogenèse au moment souhaité avec une meilleure synchronisation et des capacités de multiplication importantes menant à des rendements intéressants. De plus, le cal friable embryogène constitue un matériel de choix pour la cryoconservation et pour l'initiation de suspensions cellulaires embryogènes. Pour la transformation génétique, ce type de cal est favorable puisqu'il produit des embryons d'origine unicellulaire, ce qui diminue les possibilités d'obtention de plantes chimères.

Dans le cas du cacaoyer, l'induction d'un cal friable embryogène a été réalisée grâce à l'utilisation du système à immersion temporaire (SIT), développé à Biotrop. Ce système permet la culture en milieu liquide, mais le contact milieu/explant n'a lieu que de façon temporaire pendant une durée et selon une fréquence données, toutes deux choisies par l'expérimentateur (Teisson *et al.*, 1995). L'efficacité de ce système a été démontrée sur l'embryogenèse somatique et le microbouturage de plusieurs espèces.

Ainsi, lorsqu'un cal nodulaire âgé de 21 jours, issu de staminodes et de filets d'anthers de fleurs, est placé dans des SIT en présence du milieu d'expression, avec un temps et une fréquence d'immersion de 15 minutes 4 fois par 24 heures, on observe après 5 semaines de culture (J35) un comportement nouveau. Les cals produisent des embryons somatiques comme en milieu solide. Mais, outre la formation d'embryons, on note le développement de cals d'aspect différent de ceux obtenus sur culture en milieu solide. Ces cals sont de couleur claire et d'aspect friable (photo 6).

Une étude histologique a permis de caractériser le cal friable et de déterminer son origine. Lorsqu'ils sont placés en SIT, les cals présentent la structure nodulaire décrite précédemment (photo 3). Deux à trois semaines plus tard, certains cals se friabilisent très nettement et, en leur périphérie, on assiste à la réactivation de cellules qui se divisent (photo 7). Elles possèdent un noyau volumineux à un seul nucléole, et une ou plusieurs petites vacuoles à l'intérieur desquelles s'accumulent des composés phénoliques. Ces cellules possèdent également de très petits grains d'amidon. Certaines de ces cellules s'individualisent par épaississement de leur paroi, puis se recloisonnent et forment de petites structures de quelques cellules. Celles-ci présentent l'aspect typique de proembryons (photo 8). Les cellules de ces agrégats

continuent de se multiplier, mais cinq à six semaines après le début de la culture, leurs vacuoles accumulent de plus en plus de polyphénols. Les agrégats finissent alors par dégénérer. Les proembryons ne franchissent pas non plus les étapes ultérieures qui conduiraient à la formation d'embryons somatiques ; ils dégèrent après accumulation de polyphénols.

La culture de cals en phase d'induction en SIT a permis l'obtention d'un cal friable, dont les caractéristiques histocytologiques sont celles d'un cal embryogène avec cependant une accumulation fréquente de polyphénols. Les conditions de culture du système sont favorables à la mise en place d'un cal friable embryogène. Mais la difficulté d'entretien de ce cal, ainsi que la présence de polyphénols dans les cellules qui le constituent, montrent que le milieu n'est pas encore optimal pour permettre le maintien et l'expression de l'embryogenèse somatique.

### L'amélioration des phases tardives

Après avoir rencontré des problèmes de maturation des embryons somatiques obtenus, une étude de l'embryogenèse zygotique du cacaoyer a été réalisée. Les embryons zygotiques matures peuvent être considérés comme la référence en terme d'embryogenèse. Il semble donc intéressant d'acquérir des connaissances sur les étapes conduisant à la maturité physiologique des embryons zygotiques, pour rechercher ensuite les conditions permettant d'obtenir les mêmes séquences physiologiques chez les embryons somatiques.

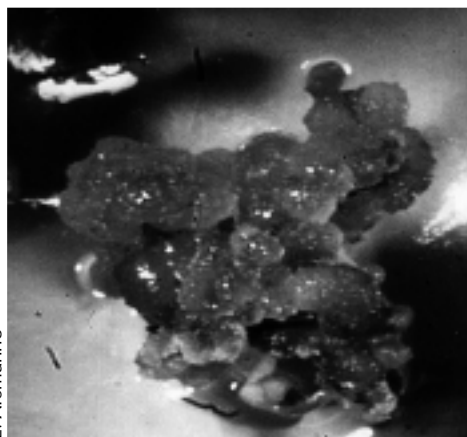
#### L'embryogenèse zygotique

Bouharmon (1960) démontre que, quelques heures après la pollinisation, l'un des noyaux mâles fusionne avec l'ooosphère pour donner le noyau du zygote qui n'entrera en division qu'environ soixante jours plus tard. À partir de cette date, on distingue trois phases :

- les embryons passent rapidement du stade globulaire au stade cotylédonaire (photo 9) : c'est l'embryogenèse *stricto sensu* qui a lieu entre 9 et 11 semaines après la pollinisation ;
- la croissance des embryons : la taille maximale est atteinte 14 à 15 semaines après la pollinisation. À ce stade, les cellules de l'axe embryonnaire et des cotylédons ne sont plus méristématiques. Elles montrent des caractères de différenciation : des vacuoles importantes dépourvues de réserves, un petit noyau par rapport au volume cellulaire total et



L. Alemanno



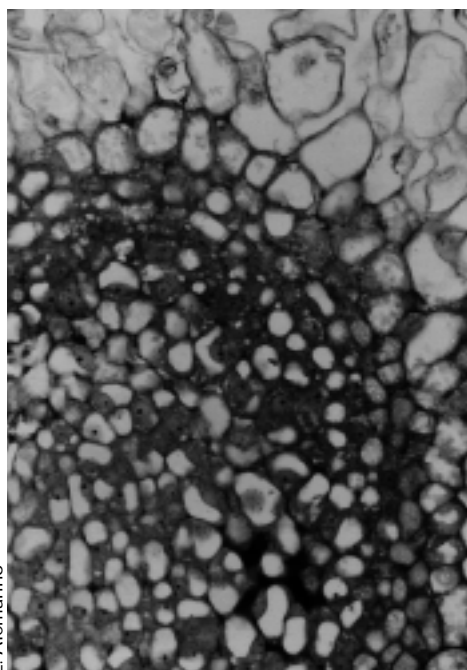
**Photo 1.** Cal nodulaire issu de staminodes après 21 jours de culture sur milieu d'induction.  
*Nodular callus obtained from staminodes after 21 days' culture on an induction medium.*

L. Alemanno



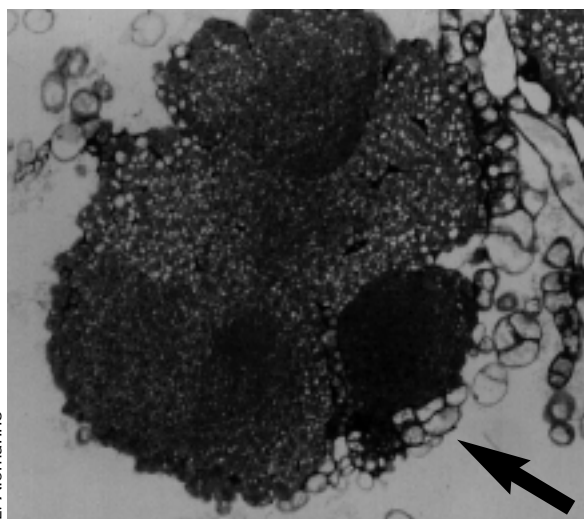
**Photo 2.** Embryons somatiques./ *Somatic embryos.*

L. Alemanno



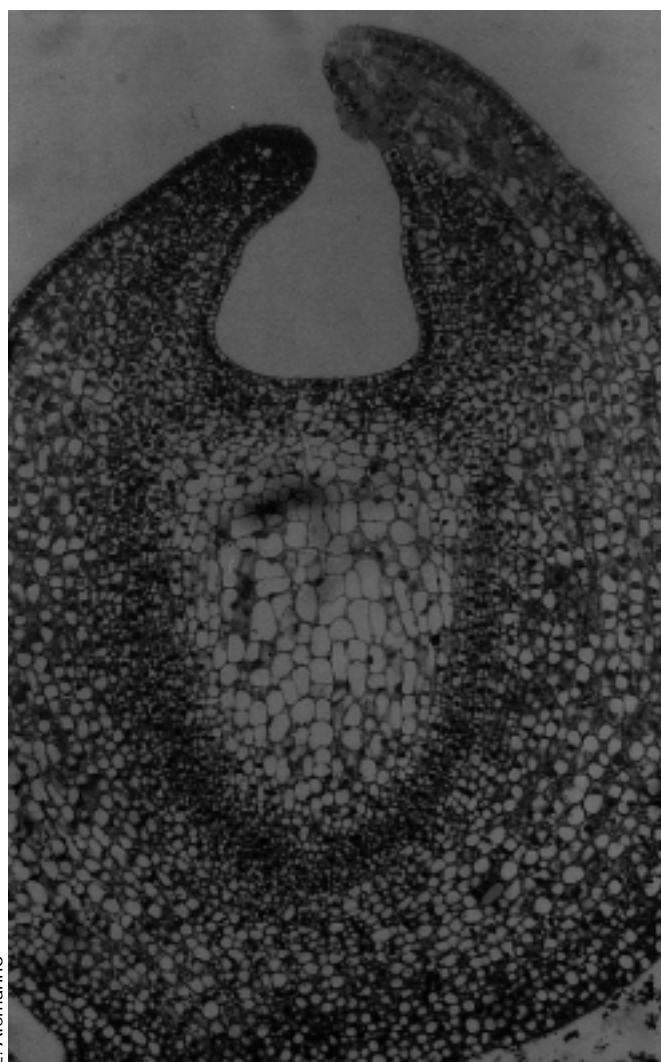
**Photo 3.** Coupe histologique d'un cal nodulaire après 21 jours de culture sur milieu d'induction.  
*Histological observation of a nodular callus after 21 days' culture on an induction medium.*

L. Alemanno



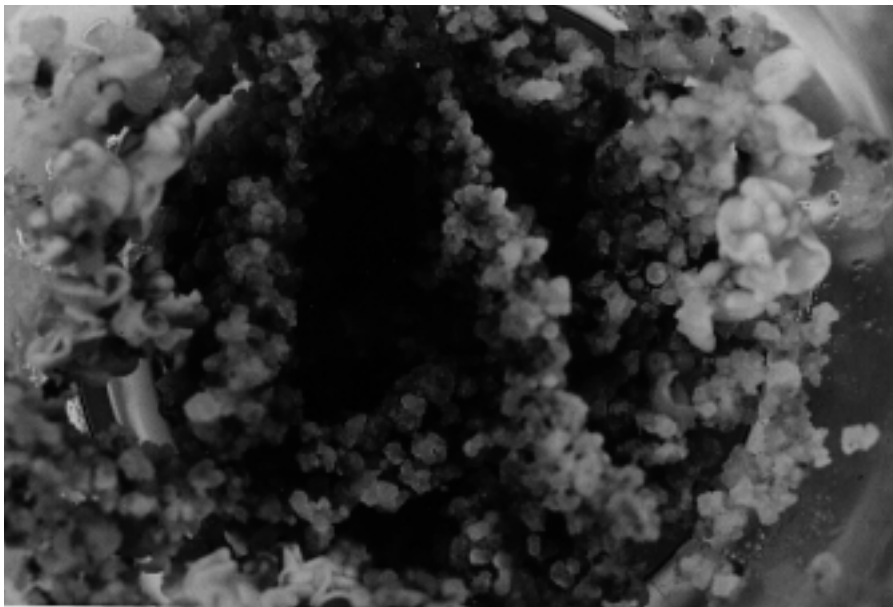
**Photo 4.** Coupe histologique d'un proembryon./ *Histological observation of a proembryo.*

L. Alemanno



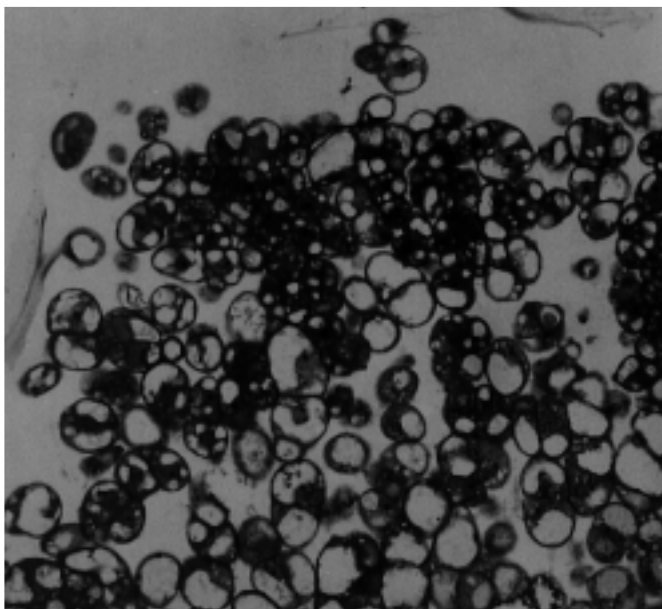
**Photo 5.** Embryon somatique au stade cotylédonaire./ *Somatic embryo at cotyledonary stage.*

L. Alemanno



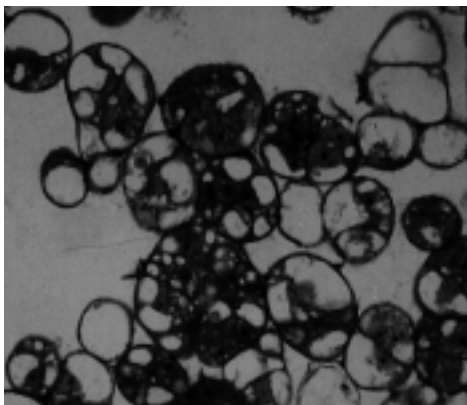
**Photo 6.** Cal friable embryogène obtenu après 5 semaines de culture en système à immersion temporaire ./ *Friable embryogenic callus obtained after 5 weeks' culture in a Temporary Immersion System.*

L. Alemanno



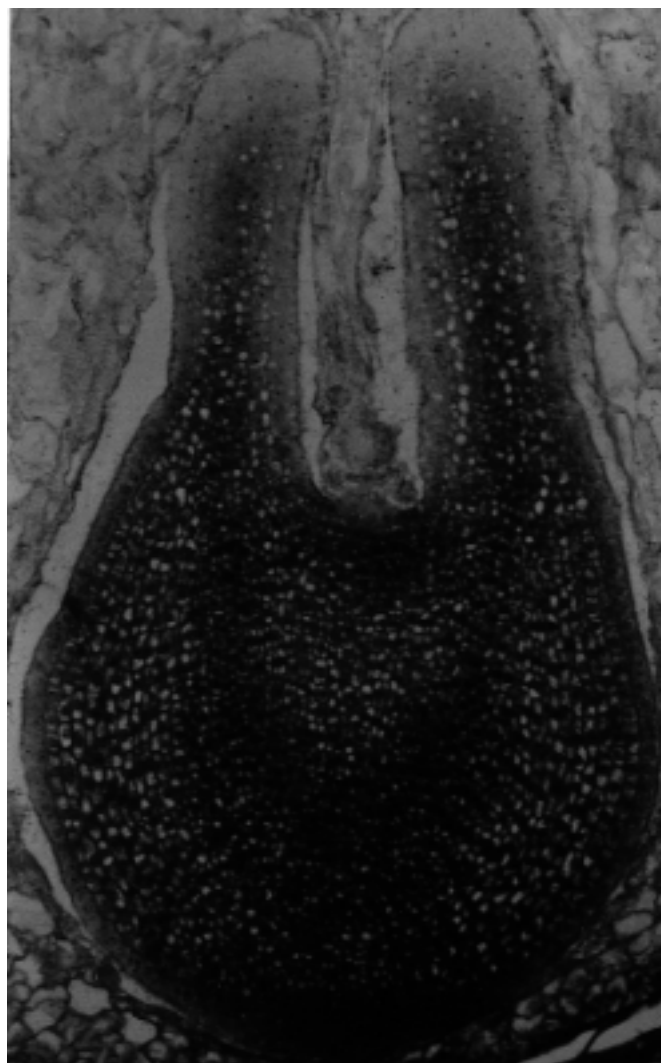
**Photo 7.** Cal friable embryogène./ *Friable embryogenic callus.*

L. Alemanno



**Photo 8.**  
Proembryons.  
*Proembryos.*

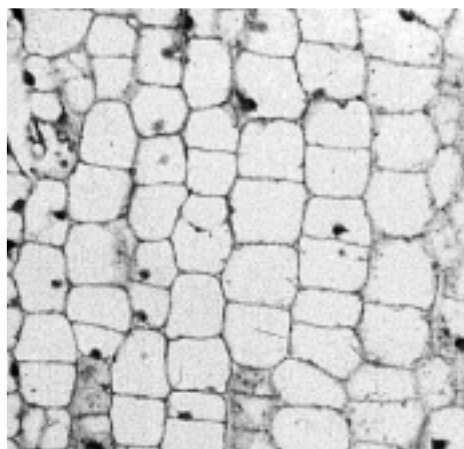
L. Alemanno



**Photo 9.** Embryon zygotique au stade cotylédonaire./ *Zygotic embryo at cotyledonary stage.*

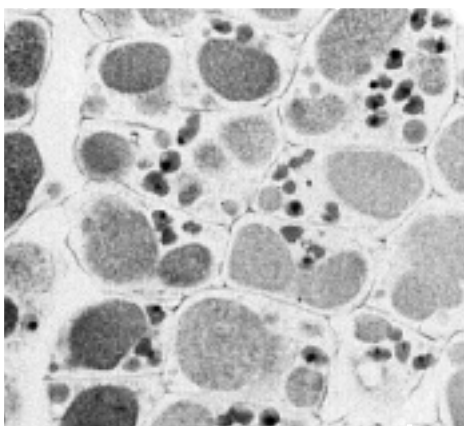


L. Alemanno



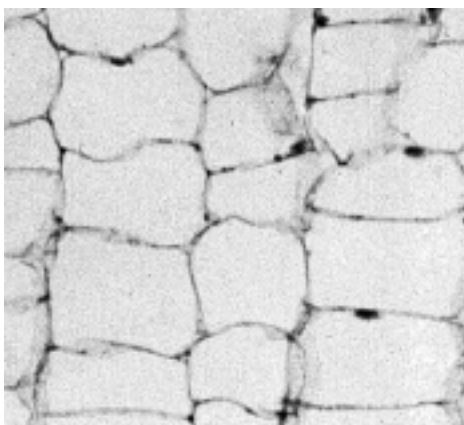
**Photo 10.** Cellules d'un embryon zygotique en fin de croissance. / *Cells of a zygotic embryo at the end of the growth period.*

L. Alemanno



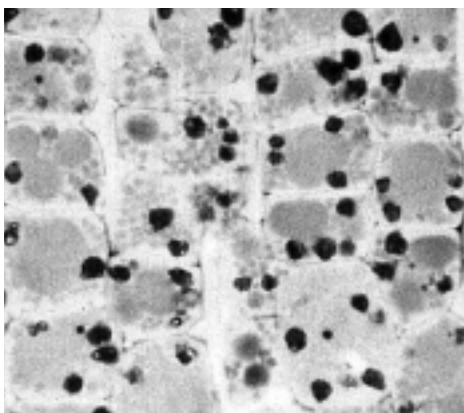
**Photo 11.** Cellules d'un embryon zygotique mature. / *Cells of a mature zygotic embryo.*

L. Alemanno



**Photo 12.** Cellules d'un embryon somatique cultivé sur milieu de maturation témoin. / *Cells of a somatic embryo cultivated on a control maturation medium.*

L. Alemanno



**Photo 13.** Cellules d'un embryon somatique cultivé sur milieu de maturation contenant de l'ABA. / *Cells of a somatic embryo cultivated on a maturation medium containing abscisic acid.*

un cytoplasme réduit (photo 10). Pendant cette période, les embryons sont totalement plongés dans l'albumen et leur teneur en eau, proche de 98 % au début, diminue légèrement et de façon régulière pour atteindre 80 % 15 semaines après la pollinisation ;

- de la fin de la croissance des embryons à leur maturité physiologique (de 15 à 21 semaines après la pollinisation). Pendant cette phase, la longueur des embryons n'augmente pas mais leur volume, et particulièrement celui des cotylédons, s'accroît. Ces organes finissent par prendre la place qu'occupait l'albumen, qui régresse petit à petit et finit par disparaître. Des analyses histologiques montrent que le fait marquant de cette période est l'enrichissement des cellules de l'embryon en réserves, celui-ci se produit de façon progressive aussi bien dans l'axe que dans les cotylédons. A maturité, les réserves sont constituées de plusieurs très gros grains d'amidon et de réserves protéiques, qui se présentent sous forme d'une grande inclusion qui occupe la quasi-totalité du volume de la cellule (photo 11).

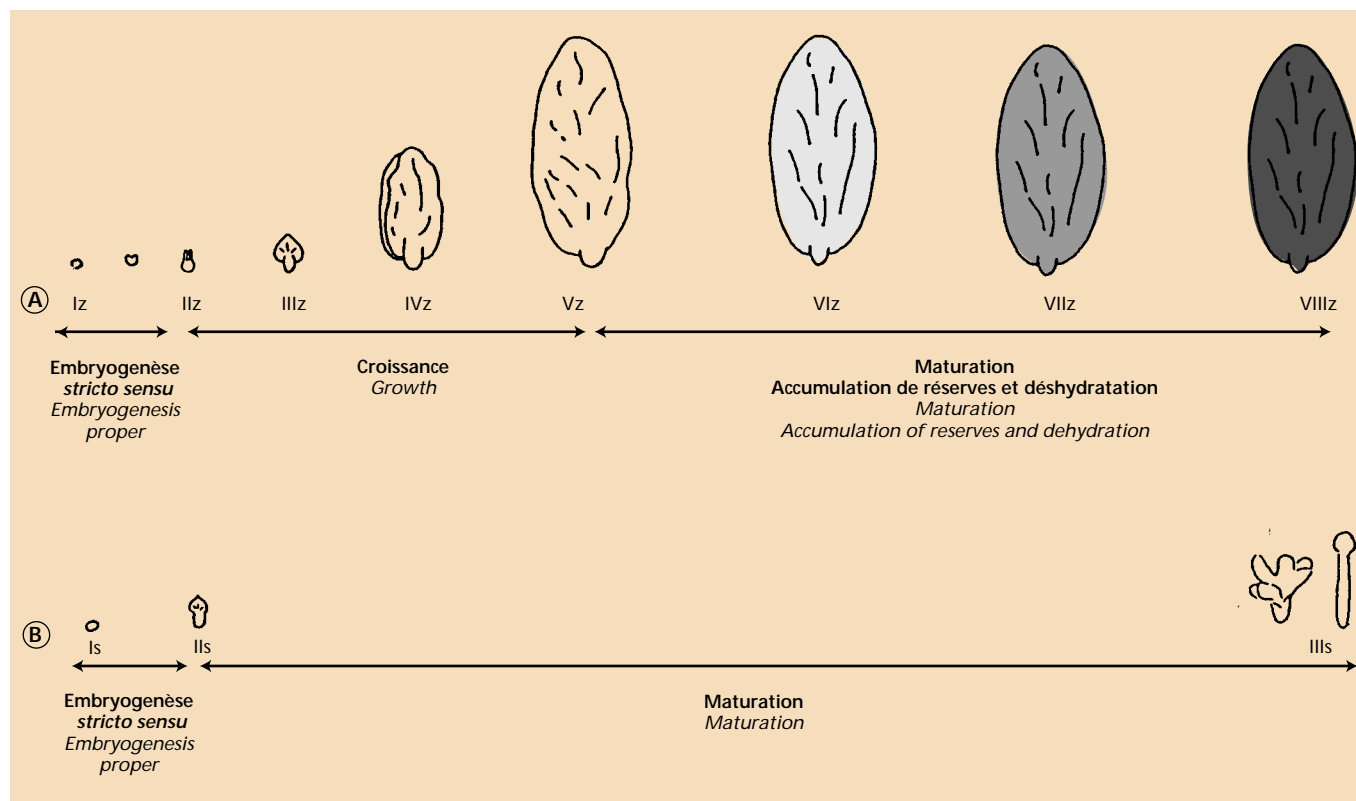
La teneur en eau des embryons, qui avait commencé à diminuer pendant la période de croissance, chute pendant la phase de maturation. D'abord de façon drastique de la 15<sup>e</sup> semaine à la 19<sup>e</sup> semaine après la pollinisation, puisqu'elle passe de 80 à 40 %, puis la déshydratation se poursuit modérément et, à maturité, les fèves ont une teneur en eau de 30 % environ.

#### ***La comparaison embryogenèse zygotique - embryogenèse somatique***

La figure 2 présente une comparaison des étapes définies lors de l'étude de l'embryogenèse zygotique et de celles appliquées par Lopez-Baez *et al.* (1993) aux embryons somatiques. Trois stades de développement des embryons somatiques sont définis :

- embryons somatiques globulaires ;
- embryons somatiques cotylédonaires ;
- embryons somatiques après maturation.

Cette comparaison permet de voir que les embryons somatiques sont placés sur milieu de maturation très tôt, alors qu'ils n'ont pas encore accompli de croissance. Les embryons somatiques mis sur le milieu de maturation doivent à la fois croître, accumuler des réserves et se déshydrater progressivement.



**Figure 2.** Comparaison des étapes de l'embryogenèse zygotique (A) et de l'embryogenèse somatique (B). / Comparison of the stages of zygotic embryogenesis (A) and somatic embryogenesis (B).

### La croissance et la maturation des embryons somatiques

Ces remarques nous ont amenés à redéfinir des séquences et des milieux de culture se rapprochant de l'embryogenèse zygotique avec comme objectifs principaux :

- permettre, dans un premier temps, la croissance des embryons ;
- améliorer l'accumulation de réserves, phénomène en relation avec l'amélioration de la germination et de la conversion des embryons somatiques.

Laissés ou repiqués sur milieu d'expression, les embryons somatiques sont capables de croître. Ainsi, 30 embryons mesurant moins de 5 mm de long transférés sur milieu d'expression soit en boîtes de Pétri, soit en SIT, mesurent après trois semaines de culture : 0,82 – 0,17 cm de longueur en boîte contre 1,19 – 0,30 cm en SIT. De plus, les embryons issus de SIT présentent un fort développement des cotylédons. Le milieu d'expression est donc utilisé en tant que milieu de croissance des embryons somatiques.

Plusieurs modifications du milieu de maturation sont entreprises pour améliorer la

synthèse de réserves par les embryons somatiques :

- la première consiste à enrichir le milieu en éléments nutritifs : saccharose et hydrolysate de caséine en vue d'augmenter les réserves amylacées et protéiques ;
- l'acide abscissique (ABA), qui intervient lors de la maturation des embryons zygotiques chez de nombreuses espèces (Etienne *et al.*, 1993 ; Bornman, 1993), est introduit dans le milieu de maturation.

L'influence des différents traitements est évaluée par des analyses histologiques et par l'appréciation des taux de germination, conversion et acclimatation des embryons somatiques. Alors qu'après 5 semaines de culture sur le milieu de maturation témoin les embryons sont dénués de réserves (photo 12), ceux, cultivés sur milieu où le maltose est remplacé par le saccharose, renferment des réserves amylacées. L'adjonction d'hydrolysate de caséine induit une faible synthèse de réserves protéiques. Mais, c'est l'addition d'ABA dans les milieux qui stimule le plus favorable-

ment la synthèse de réserves amylacées et protéiques. Celles-ci ressemblent alors aux réserves des embryons zygotiques matures (photo 13). Cette amélioration se traduit également par une augmentation des taux de germination, de conversion et d'acclimatation.

### Conclusions et perspectives

Pour la première fois dans l'histoire de l'embryogenèse somatique du cacaoyer, de sérieux espoirs d'utilisation de ce procédé de multiplication sont nés, en 1993, avec les travaux de Lopez-Baez *et al.* Notre étude en a montré les avantages évidents, notamment la possibilité d'obtention de plantules à partir de tissus sporophytiques, mais elle en a aussi décelé les limites actuelles qui l'empêchent d'atteindre son utilisation pratique. Pour y parvenir, l'embryogenèse somatique doit répondre à certaines conditions que nous allons aborder et commenter.

Le procédé d'embryogenèse somatique doit pouvoir s'appliquer au plus grand nombre possible de géotypes. Dans notre



étude, nous avons travaillé sur 25 d'entre eux, et une très faible proportion s'est révélée embryogène.

La seconde exigence d'un système d'embryogenèse somatique efficace réside dans son fort pouvoir de multiplication. Pour cela, il est quasiment indispensable de maîtriser l'entretien d'un cal à potentialités embryogènes que l'on peut orienter, à volonté, vers la production d'embryons somatiques. Tel n'est pas le cas dans le procédé initialement décrit ; les quelques cellules méristématiques induites se dirigent toutes vers l'embryogenèse. Nous avons montré combien il était délicat d'entretenir des cultures. Toutefois, grâce au SIT, la voie vers l'entretien de la capacité embryogène est désormais ouverte. Un cal friable embryogène a été obtenu. Mais son existence est fugace, il est de nature hétérogène et son entretien n'a pu être réalisé. Une meilleure définition des milieux d'entretien de ce cal, ainsi que les conditions de régénération restent à étudier. Le cal friable embryogène amélioré pourra également servir de base à l'initiation puis à l'établissement de suspensions cellulaires embryogènes.

Dans le système que nous avons étudié, les embryons sont d'origine multicellulaire, ce qui constitue deux inconvénients majeurs. D'après les résultats que nous avons obtenus, il semble que ce type d'ontogenèse soit, entre autres, à l'origine de nombreuses et fréquentes anomalies morphologiques. Dans la littérature, aucune relation entre l'origine des embryons somatiques et leur conformité n'a jamais été clairement établie. Néanmoins, l'origine pluricellulaire survient au sein de cals non friables, alors que l'origine unicellulaire est plutôt associée aux cals friables. Il est évident que les conditions de l'induction et de la régénération interviennent aussi sur la conformité morphologique des embryons somatiques.

Le second désavantage de l'origine pluricellulaire apparaît dès lors que l'on envisage des recherches de transformation génétique. En effet, le risque d'obtention de plantes chimériques est augmenté. Par l'utilisation de cal friable en immersion temporaire ou en milieu liquide, il est probable, d'après les exemples décrits dans la littérature, que les embryons somatiques régénérés proviennent du recloisonnement d'une ou d'un petit nombre de cellules embryogènes, donc d'origine uni ou paucicellulaire. Le développement d'une méthode de régénération à partir de cal friable est donc une voie royale pour l'optimisation du procédé de multiplication par embryogenèse somatique.

Enfin, le dernier point qui conditionne la validité d'un procédé d'embryogenèse somatique est le bon déroulement des phases tardives, pour qu'elles aboutissent à la conversion des embryons en plantules. Grâce à une étude comparative entre les embryogenèses zygotique et somatique, nous avons mis en évidence les limites du procédé. L'induction de la synthèse de molécules de réserves par les embryons somatiques a été obtenue. Toutefois, plusieurs axes de recherche devraient permettre d'optimiser ces événements tardifs. Tout d'abord, il conviendrait de définir la composition d'un milieu de croissance des embryons somatiques dont la teneur en régulateurs de croissance serait proche de la balance hormonale qui intervient dans la croissance *in vivo*. Le second aspect concerne le statut hydrique des embryons somatiques : l'introduction d'une phase de dessiccation, après la phase de maturation, devrait améliorer leur germination. Des essais préliminaires nous permettent d'espérer beaucoup de ce facteur. Enfin, la composition des milieux de germination et de conversion des embryons somatiques devra être optimisée. ■

## Bibliographie / References

- ALEMANN L., BERTHOULY M., MICHAUX-FERRIERE N., 1996. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues in *Theobroma cacao* L. Plant Cell Tissue Organ Cult. (sous presse).
- BORNMAN C.H., 1993. Maturation of somatic embryos. In : Synseeds, K. Redenbaugh éd., Boca Raton, Etats-Unis, CRC Press, p. 105-113.
- BOUHARMONT J., 1960. Développement normal de la graine et du fruit. In : Recherches cytologiques sur la fructification et l'incompatibilité chez *Theobroma cacao* L. Série Scientifique, Institut national pour l'étude agronomique du Congo (89) : 18-39.
- ESAN E.B., 1977. Tissue culture studies on cocoa (*Theobroma cacao* L.). A supplementation of current research. In : Conférence internationale sur les recherches cacaoyères, Ibadan, Nigeria, 1-9 septembre 1975. Ibadan, Nigeria, Cocoa Research Institute of Nigeria, 1977, p. 116-125.
- ETIENNE H., SOTTA B., MONTORO P., MIGINIAC E., CARRON M.P., 1993. Comparison of endogenous ABA and IAA contents in somatic and zygotic embryos of *Hevea brasiliensis*. Plant Sci. 92 (1) : 111-119.
- GRAPIN A., 1995. Régénération par embryogenèse somatique en milieu liquide et transformation génétique par biolistique de bananiers di et triploïdes. Thèse de doctorat, Ecole nationale supérieure agronomique de Montpellier, France, 90 p.
- LOPEZ-BAEZ O., BOLLON H., ESKEA A.B., PÉTIARD V., 1993. Embryogenèse somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. à partir de pièces florales. CR Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie 316 (6) : 579-584.
- MONTORO P., ETIENNE H., MICHAUX-FERRIERE N., CARRON M.P., 1993. Callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 33 (3) : 331-338.
- REDENBAUGH K., 1993. Introduction. In : Synseeds, K. Redenbaugh éd., Boca Raton, Etats-Unis, CRC Press, p. 3-7.
- SÖNDAHL M.R., LIU S., BELLATO C.M., BRAGIN A., 1993. Cacao somatic embryogenesis. Acta Hortic. (336) : 245-248.
- TEISSON C., ALVARD D., BERTHOULY M., COTE F., ESCALANT J.V., ETIENNE H., 1995. Culture *in vitro* par immersion temporaire : un nouveau réceptif. Plant. Rech. Dév. 2 (5) : 29-31.

# Somatic embryogenesis of cocoa from floral parts

Alemanno L.<sup>1</sup>, Berthouly M.<sup>1</sup>, Michaux-Ferrière N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

<sup>2</sup> CIRAD-GERDAT, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

Yields and quality are two major objectives of cocoa research. Obtaining clonal varieties of the main genotypes would guarantee uniform yields. Their creation by somatic embryogenesis is a source of great expectations. Some stages remain to be mastered, some solutions are proposed.

The cocoa tree, which originates from tropical America, has always played a major economic role. From the use of cocoa beans as a currency by the Aztecs and Mayas, it has now become an important source of income for several developing countries. CIRAD cocoa research has two main objectives: increasing plantation yields, and improving cocoa quality. Genetic breeding is one of the main ways of improving yields and has led to the creation of improved varieties: clones and interclonal hybrids. Even so, breeders face two problems. As this is a perennial plant, conventional breeding programmes extend over several years: 15 years on average for one selection cycle. Secondly, as the cocoa tree is primarily cross-fertilizing, hence highly heterozygous, hybrids often reveal substantial within-family variability. If breeding programmes were to be provided with an effective vegetative propagation method, the length of the breeding cycles would be reduced and it would be possible to multiply the most worthwhile hybrid individuals from the combinations being assessed. Clonal varieties could then be distributed to producers, thereby guaranteeing them more uniform yields.

Horticultural vegetative propagation (cuttings and buddings) involves several drawbacks. Budding, which is used on estates in Malaysia, requires good technical skills and involves a risk of chupon growth from the rootstock. Plagiotropic cuttings have an unbalanced aerial system and, particularly, a horizontal running root system, giving them little drought resistance. Orthotropic cuttings develop a tap root, but their canopy formation height is lower than with seedlings. Moreover, only a small number of orthotropic scions can be taken from a tree. This is why the development of a rapid, true-to-type mass propagation system, such as somatic embryogenesis, continues to provide hope for cocoa genetic improvement. It was achieved by Esan with immature zygotic embryos as early as 1977. However, as this plant is primarily cross-fertilizing and gives heterogeneous progenies, somatic

embryogenesis from sporophytic tissues - leaf, nucellus, inner integument and petal - was studied but gave variable and not particularly satisfactory results. The first effective production of somatic embryos from floral buds, and their conversion into plantlets, was reported by Söndahl *et al.* (1993), and by Lopez-Baez *et al.* (1993). The latter study is the basis of our work, which is summarized here. The work initially consisted in testing this technique on a wider genetic base, on clones belonging to three groups of cocoa trees (Forastero, Criollo, Trinitario). Combined with histological and biochemical analyses, these studies contributed to our understanding of the phenomenon and revealed the principal constraints. We then went on to improve these points.

## Description and definition of the culture protocol

Somatic embryogenesis is a phenomenon by which a somatic cell, or group of cells, is capable of forming an embryo, i.e. a structure with bilateral symmetry independent from the callus, possessing a stem apex and a root apex, whose development gives rise to a plantlet. This process is made possible by a peculiarity of plant cells: totipotency, i.e. the ability of already specialized cells to dedifferentiate, to divide then differentiate again, depending on experimental conditions. The somatic embryos obtained have the same genotype as the plant from which they came.

In cocoa, somatic embryogenesis was obtained using the technique described by Lopez-Baez *et al.* (1993), from staminodes and anther filaments taken from immature floral buds. It involved several stages (figure 1): first, calli were induced by hormonal shock (2,4-D/kinetin) (photo 1) on an induction medium. These calli, which were then transferred to a hormone-free expression medium, regenerated somatic embryos (photo 2). The latter were transferred in succession to maturation, germination and growth media prior to acclimatization in the greenhouse.

## Analysis of the procedure and determination of constraints

### Assessment of genotypic variability

The table shows the success rate for obtaining embryogenic explants from staminodes and anther filaments for all the genotypes assessed. The genetic group to which they belong is indicated.

Of the 25 genotypes tested, only 5 proved to be embryogenic. The belonged to the Upper Amazon Forastero group and revealed very different results: from 81.5 to 1.2% embryogenic explants. The response to somatic embryogenesis revealed definite variability depending on the genotype, a factor already well-known in this process. Although this study is insufficient to conclude that there is a correlation between the response to embryogenesis and the fact of belonging to a given group, we saw that the genotypes with the highest embryogenesis ability were all Upper Amazon Forasteros (though they were the most represented clones). It is interesting to note that the genotypes reported to be embryogenic by Lopez-Baez *et al.* (1993) belonged to the Forastero group: EET 48, EET 64, EET 94, EET 228 (Ecuadorian Forastero) and CC 260 ("Nacional" Forastero).

### Somatic embryo origin

For the genotypes that were embryogenic under our culture conditions, a histological study (Alemanno *et al.*, 1996) determined the origin of the somatic embryos. At the end of the callogenesis period, the calli were made up of nodules (photo 3), themselves comprising meristematic cell groups of various sizes, surrounded by parenchymatous type cells. In the expression medium, the cells split to form well developed meristematic zones. Around a week later, some meristematic cells acquired embryonic characters, i.e. characters found in the cells of young zygotic embryos. The cells had a high nucleo: cytoplasmic ratio, a dense cytoplasm rich in soluble proteins and a large

nucleus with a large, strongly coloured nucleolus. These cells had no starch reserves. Some of the cells clustered together and became isolated from neighbouring cells. Given what they were to become, these cells could be seen as proembryos (photo 4). They acquired a protodermis, procambial bundles and then shoot and root meristems, passing through the following stages: globular, heart and cotyledonary (photo 5), mimicking ontogenesis in zygotic embryos. The somatic embryos were therefore of multicellular origin. The callus surrounding the embryos was made up of highly differentiated, degenerating cells, alongside polyphenol accumulation.

The somatic embryos showed differing degrees of conformity with respect to zygotic embryos. Some embryos had more than two cotyledons, whilst others were fused. We also observed isolated embryogenic structures with a protodermis and procambial bundles but no apical meristem. Such structures were unable to develop into somatic embryos and were classed as "trunk" embryos. Under standard conditions, embryo distribution in each category for genotype NA 79 was as follows: normal embryos: 20.7%, fused embryos: 6.5%, "trunk" embryos: 72.8%, which means a low proportion of normal embryos.

### The later stages of somatic embryogenesis

If somatic embryogenesis is to be used in genetic improvement programmes, it is essential that once obtained, the somatic embryos be capable of developing into plantlets. Although in many cases of somatic embryogenesis, there are no longer any problems with obtaining somatic embryos, each of the subsequent phases is often limiting (Redenbaugh, 1993), which reduces the prospects for practical application of this propagation procedure. We encountered these problems with cocoa, and were unable to obtain any plantlets during our preliminary trials.

Following these initial studies, several constraints during somatic embryogenesis from floral buds were identified:

- under the conditions described, multiplication of the cells at the origin of the somatic embryos (meristematic and embryonic cells) is not sustained, hence embryogenic capacity is not maintained. This is an essential precondition for increasing the efficacy and therefore the use of the technique;
- the multicellular origin of the somatic embryos is an additional difficulty for genetic transformation;
- the somatic embryos very often have morphological abnormalities, and this hinders their subsequent conversion;

- embryo maturation, germination and conversion difficulties have been seen;
- substantial genotypic variability has been seen at every stage of somatic embryogenesis.

Research aimed at improving some of these stages was undertaken and the results are given below.

## Improving the procedure

### Maintaining embryogenic capacity via friable calli

The friable embryogenic callus route is interesting for several reasons. This type of callus enables maintenance of embryogenic capacity in several species, either on semi solid medium, for example with *Hevea* (Montoro *et al.*, 1993), or in liquid medium, for example with banana (Grapin, 1995). This limits the constraints linked to explants and enables embryogenesis expression at the appropriate time, with better synchronization and higher multiplication capacities, hence better outputs. Moreover, friable embryogenic calli are ideal for cryopreservation and for the initiation of embryogenic cell suspensions. This type of callus also favours genetic transformation, since it produces embryos of single cell origin, hence reducing the risk of chimeras.

In the case of cocoa, friable embryogenic calli were induced using a temporary immersion system (TIS) developed by BIOTROP. The system enables culture in a liquid medium, but the explant is only temporarily in contact with the medium, for a given time lapse and at a given frequency, chosen by the research worker (Teisson *et al.*, 1995). The efficacy of the system has been demonstrated for the somatic embryogenesis and microcutting of several species.

For cocoa, 21 day old nodular calli obtained from staminodes and anther filaments were placed in a TIS with an expression medium, with an immersion time and frequency of 15 minutes four times per 24 hours. After 5 weeks' culture (D35), a new type of performance was observed. The calli produced somatic embryos in the same way as on solid medium, but in addition to embryo formation, we also observed the development of calli that looked different from those obtained on solid medium: they were light in colour and looked friable (photo 6).

A histological study characterized the friable calli and determined their origin. When they were placed in a TIS, the calli had the nodular structure described above (photo 3). Two to three weeks later, some calli had very clearly become friable, and on their edges, cells were reactivated and divided (photo 7). The cells had a large nucleus with a single nucleolus, one or more small vacuoles and very small starch

grains. Some of the cells individualized by a thickening of the cell wall, and divided to form small clusters of several cells, which looked like typical proembryos (photo 8). The cells of these clusters continued to multiply, but five to six weeks after the start of culture, their vacuoles accumulated increasing amounts of polyphenols, and the clusters began to degenerate. The proembryos also failed to complete the subsequent stages leading to somatic embryo formation; they degenerated following polyphenol accumulation.

Culturing calli at the end of the induction phase in a TIS produced a friable callus with the same histo-cytological characteristics as embryogenic calli, albeit with frequent polyphenol accumulation. The culture conditions in the system favour the development of friable embryogenic calli, but the difficulty of maintaining such calli and the presence of polyphenols in its constituent cells proved that the medium is not yet ideal for somatic embryogenesis maintenance and expression.

### Improving subsequent stages

Given the problems encountered with maturation of the somatic embryos obtained, a study was made of zygotic embryogenesis in cocoa. Mature zygotic embryos can be considered as a reference in terms of **embryogenesis**, and it was therefore considered worthwhile investigating the stages leading to physiological maturity of zygotic embryos, with a view to identifying the conditions for obtaining the same physiological sequences in somatic embryos.

### Zygotic embryogenesis

Bouharmont (1960) showed that a few hours after pollination, one of the male nuclei fuses with the oosphere to produce the zygote nucleus, which does not divide until some sixty days later. There are subsequently three distinct phases:

- the embryos pass rapidly from the globular stage to the cotyledonary stage (photo 9): this is embryogenesis in its strictest sense, which occurs between nine and eleven weeks after pollination;
- embryo growth: maximum size is achieved 14 to 15 weeks after pollination. At this stage, the cells of the embryonic axis and of the cotyledons are no longer meristematic, and show differentiation characters: large vacuoles with no reserves, a small nucleus in relation to the total cell volume and limited cytoplasm (photo 10). During this period, the embryos are totally immersed in the albumen and their water content - around 98% to begin with - falls **slightly but steadily, reaching 80% 15 weeks after pollination**;
- from the end of embryo growth to their physiological maturity (15 to 21 weeks after pol-

lination). During this phase, embryo length does not increase but their volume, particularly that of the cotyledons, does. These organs take over the space occupied by the albumen, which shrinks gradually and disappears. Histological analyses show that the key factor in this stage is the development of embryo cell reserves, which occurs gradually in both the axis and the cotyledons. Once mature, the reserves contain several very large starch grains and protein reserves, in the form of a large inclusion that takes up almost all the cell volume (photo 11).

Embryo water content, which begins to fall during the growth period, continues to fall during the maturation phase, first sharply from the 15th to the 19th week after pollination, from 80 to 40%, then more steadily, to a water content of around 30% in mature beans.

### **The comparison between zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis**

Figure 2 compares the stages defined during the study of zygotic embryogenesis and those applied by Lopez-Baez *et al.* (1993) to somatic embryos. Three somatic embryo development stages are defined:

- globular somatic embryos;
- cotyledonary somatic embryos;
- somatic embryos after maturation.

This comparison shows that somatic embryos are placed on a maturation medium very early on, whereas they have not yet grown at all. The somatic embryos placed on a maturation medium have to simultaneously grow, accumulate reserves and dehydrate gradually.

### **Somatic embryo growth and maturation**

These observations led us to redefine the sequences and culture media closest to zygotic embryogenesis with the following main aims:

- initially to enable embryo growth;
- to improve reserve accumulation in relation with improved germination and conversion of somatic embryos.

If left on or transferred to an expression medium, somatic embryos are capable of growing. For example, 30 embryos less than 5 mm long were transferred to an expression medium, either in Petri dishes or in a TIS; after three weeks' culture, they were  $0.82 \pm 0.17$  cm long in Petri dishes compared to  $1.19 \pm 0.30$  cm in a TIS. Furthermore, the embryos produced in a TIS showed strong cotyledon development. The expression medium is therefore used as the somatic embryo growth medium.

Several modifications to the maturation medium have been tested to improve reserve synthesis by somatic embryos:

- enriching the medium with nutrients - sucrose and casein hydrolysate - in an attempt to increase starch and protein reserves;
- adding abscisic acid (ABA), which is involved in zygotic embryo maturation in many species (Etienne *et al.*, 1993; Bornman, 1993), to the maturation medium.

The effect of the different treatments was evaluated by histological analyses and by assessing germination, conversion and acclimation. Whereas after five weeks' culturing on the control maturation medium, the embryos had no reserves (photo 12), those cultured on a medium containing sucrose rather than maltose had starch reserves. Adding casein hydrolysate led to slight protein reserve synthesis, but adding ABA to the media resulted in a greater increase in starch and protein reserves, which were similar to those in mature zygotic embryos (photo 13). This improvement also resulted in increased germination, conversion and acclimation rates.

## **Conclusions and prospects**

For the first time ever in somatic embryogenesis of cocoa, real hopes of using this propagation procedure were raised by the work carried out by Lopez-Baez *et al.* in 1993. Our study showed its clear advantages, primarily the possibility of producing plantlets from sporophytic tissue, but also revealed its current limitations, preventing its practical application. If this is to be achieved, somatic embryogenesis has to satisfy certain conditions that are set out and discussed below.

The somatic embryogenesis procedure has to be applicable to as many genotypes as possible. In our study, we worked on 25, and only a very small proportion proved to be embryogenic.

The second condition for effective somatic embryogenesis systems is their high multiplication capacity. To this end, it is almost essential to be able to maintain calli with embryogenic potential that can be steered towards somatic embryo production as and when required. This is not the case with the procedure described initially; the few meristematic cells induced all went on to embryogenesis. We showed how difficult it is to maintain cultures. However, using TIS, a friable embryogenic callus has been obtained. Nevertheless, its existence was fleeting, it was heterogeneous and it proved impossible to maintain. Studies now need to look at the media for maintaining such calli and the conditions for their regeneration. Improved friable embryogenic calli could also be used as the basis for the initiation and establishment of embryogenic cell suspensions.

In the system that we studied, the embryos were of multicellular origin, which entails two major drawbacks. According to our results, this

type of ontogenesis often seems to result in various morphological abnormalities. However, the multicellular origin occurs with non-friable calli, whereas the single cell origin is generally associated with friable calli; It is clear that induction and regeneration conditions also affect the morphological conformity of somatic embryos. The second drawback of the multicellular origin occurs when considering the possibility of genetic transformation, since there is an increased risk of producing chimeras. According to the examples given in the literature, using friable calli in temporary immersion or in liquid media, it is likely that the regenerated somatic embryos stem from the re-partitioning of one embryogenic cell or a small number of cells, hence from a single cell or very few cells. The development of a regeneration method using friable calli would therefore seem to be the ideal way of optimizing propagation by somatic embryogenesis.

Lastly, what governs the validity of a somatic embryogenesis procedure is the effective completion of the later stages, leading to embryo conversion into plantlets. A comparative study of zygotic and somatic embryogenesis revealed the limitations of the procedure. Reserve molecule synthesis by somatic embryos has been induced, but several lines of research still need to be followed to optimize these later stages. Firstly, it is important to define the composition of a somatic embryo growth medium with a growth regulator content close to the hormone balance seen in *in vivo* growth. The second aspect concerns the water status of the somatic embryos: introducing a desiccation phase after the maturation phase should improve germination rates. Preliminary studies have raised great hopes in this respect. Lastly, somatic embryo germination and conversion medium composition needs to be optimized. ■



## Résumé

*Theobroma cacao* L. est une espèce pérenne, préférentiellement allogame, pour laquelle l'embryogenèse somatique à partir de tissus sporophytiques constitue un espoir pour la multiplication et les échanges de matériel végétal. Une première réussite d'embryogenèse somatique à partir de boutons floraux a servi de point de départ à cette étude. Après avoir testé le procédé sur 25 génotypes et dans des conditions de culture définies, des variations génotypiques ont été mises en évidence. Un suivi histologique de l'ontogenèse des embryons somatiques a montré qu'ils sont d'origine pluricellulaire. La recherche de conditions favorables à la sélection et à l'entretien des cellules méristématiques (à l'origine des embryons somatiques) et embryogènes, par la culture en milieu liquide en système à immersion temporaire (SIT) a été envisagée. Un cal friable embryogène a été obtenu. Afin d'améliorer le déroulement des phases tardives des embryons somatiques, une étude de l'embryogenèse zygotique a été réalisée. Elle est caractérisée par une période de croissance des embryons, suivie d'une période d'accumulation de réserves amylacées et protéiques, pendant laquelle se produit une dessiccation lente et modérée. L'introduction dans le protocole d'embryogenèse somatique d'une phase de croissance, ainsi que la définition d'un milieu de maturation contenant de l'acide abscissique (ABA) a permis d'améliorer la maturation des embryons.

## Abstract

*Theobroma cacao* L. is a primarily cross-fertilizing perennial species, for which somatic embryogenesis from sporophytic tissues provides a hope for propagation and planting material exchanges. The first successful somatic embryogenesis from floral buds served as the springboard for this study. The procedure was tested on 25 genotypes under defined culture conditions, revealing genotypic variations. Histological monitoring of somatic embryo ontogenesis revealed that they were of multicellular origin. The right conditions for the selection and maintenance of meristematic cells (from which somatic embryos are derived) and embryogenic cells were sought by culturing in a liquid medium using a temporary immersion system (TIS). A friable embryogenic callus was obtained. A study of zygotic embryogenesis was carried out with a view to improving the later stages of somatic embryogenesis. It is characterized by a period of embryo growth, followed by accumulation of starch and protein reserves, during which slow and moderate desiccation occurs. By adding a growth phase to the somatic embryogenesis protocol, and defining a maturation medium containing abscisic acid (ABA), embryo maturation was improved.

## Resumen

*Theobroma cacao* L. es una especie perenne, preferentemente alegama, cuya embriogénesis somática a partir de tejidos sporofíticos constituye una esperanza para la multiplicación y los intercambios de material vegetal. Un primer éxito de embriogénesis somática a partir de yemas florales ha servido de punto de partida para este estudio. Después de haber sometido el procedimiento a prueba en 25 genotipos y en las condiciones de cultivo definidas, se evidenciaron variaciones genotípicas. Una vigilancia histológica de la ontogénesis de los embriones somáticos mostró que son de origen pluricelular. Se examinó la búsqueda de condiciones favorables para la selección y el mantenimiento de las células meristémicas (al origen de embriones somáticos) y embriógenas, al cultivarlas en medio líquido en sistema de inmersión temporaria (SIT). Se logró un callo desmenuzable embriógeno. Para mejorar el desarrollo de las fases tardías de los embriones somáticos, se realizó un estudio de la embriogénesis zigótica. Está caracterizada por un período de crecimiento de los embriones, seguido de un período de acumulación de reservas amiláceas y proteicas, durante el cual se produce una desecación lenta y moderada. La introducción en el protocolo de embriogénesis somática de una fase de crecimiento, así como la definición de un medio de maduración que contiene ácido abscísico (ABA) permitió mejorar la maduración de los embriones.